

ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA(ESAB)
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA (UPC)



Capacitat de fongs endòfits d'arrel per induir resposta sistèmica envers *Meloidogyne* spp. en cultius de solanàcies i cucurbitàcies

TREBALL FINAL DE GRAU

Grau en Enginyeria Agrícola

Autora:

Míriam Pocurull Domènech

Professor tutor:

Francesc Xavier Sorribas Royo

Juny – 2016

**CAPACITAT DE FONGS ENDÒFITS D'ARREL PER INDUIR RESPOSTA SISTÈMICA ENVERS
Meloidogyne spp. EN CULTIUS DE SOLANÀCIES I CUCURBITÀCIES**

Autora: **Pocurull Domènech, Míriam**

Tutor: **Sorribas Royo, Francesc Xavier**

RESUM

Els nematodes fitoparàsits del gènere *Meloidogyne spp.* són causants de pèrdues de producció molt importants en horticultura. La presència de fongs endòfits de manera natural en el sòl amb la capacitat d'induir una resposta a la planta envers el patogen és un punt poc estudiat.

En el present projecte final de grau es van avaluar la capacitat endofítica de 6 aïllats de *Pochonia chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2, S2_C5, S2_H8, S1_H7 i S1_H6) en 3 cultius susceptibles al nematode (tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma). La capacitat endofítica dels aïllats va ser d'entre el 5 i 88%, sense observar diferències entre els cultivars per a cada aïllat, o entre els diferents aïllats respecte el cultivar. Alhora, es va avaluar la capacitat dels aïllats de parasitar ous i juvenils de *Meloidogyne spp.* Els diferents aïllats parasitaven entre 23 i el 89% dels ous però la capacitat dels fongs de parasitar juvenils va ser molt baixa o nul·la.

Paral·lelament, es va treballar amb el sistema "Split root" per tal d'avaluar les induccions de resposta sistèmica de 3 aïllats de *P. chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2 i S2_C5) i 2 aïllats de *Trichoderma spp.* (T22 i T34) sobre *Meloidogyne spp.* La resposta induïda es va avaluar en tomàquet cv Durinta i cogombre cv Dasher II. Es va avaluar l'efecte sobre el desenvolupament de la planta a través del pes fresc radicular, pes sec aeri i superfície foliar. Així com l'efecte sobre la capacitat infectiva i reproductora del nematode a través del número de masses d'ous i del número d'ous per planta, respectivament. Es va calcular l'índex de resistència.

El aïllats no van afectar el desenvolupament de la planta, però sí la capacitat infectiva i reproductora del nematode, afavorint la infecció i reproducció en cogombre, i disminuint-la en tomàquet. Aquests resultats mostren la diferent interacció que estableixen els endòfits amb la planta, el que pot condicionar el desenvolupament del nematode.

Paraules clau: *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma spp.*, inducció de resposta

CAPACIDAD DE HONGOS ENDOFITOS DE RAZA PARA INDUCIR RESPUESTA SISTÉMICA CONTRA <i>Meloidogyne spp.</i> EN CULTIVOS DE SOLANACEAS Y CUCURBITACEAS
--

Autora: **Pocurull Domènech, Míriam**

Tutor: **Sorribas Royo, Francesc Xavier**

RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne spp.* son causantes de pérdidas de producción muy importantes en horticultura. La presencia de hongos endófitos de manera natural en el suelo con la capacidad de inducir una respuesta a la planta frente a los patógenos es un tema poco estudiado.

En el presente proyecto final de grado se evaluó la capacidad endofítica de 6 aislados de *Pochonia chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2, S2_C5, S2_H8, S1_H7 i S1_H6) en 3 cultivos susceptibles a los nematodos (tomate cv Durinta, pepino cv Dasher II y melón cv Paloma). La capacidad endofítica de los aislados fue entre 5 i 88%, sin observar diferencias entre los cultivares y el aislado o entre los distintos aislados frente a los cultivares. También se evaluó la capacidad parasítica de los aislados de huevos y juveniles de *Meloidogyne spp.* Los distintos aislados parasitaban entre el 23 i el 89% de los huevos pero los valores de parasitismo de los juveniles fueron muy bajos, y no se observaron diferencia entre los aislados.

Simultáneamente se trabajó con el sistema "Split root" para poder evaluar la inducción de respuestas sistémicas de los 3 aislados de *P. chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2 i S2_C5) y 2 aislados de *Trichoderma spp.* (T22 i T34) sobre *Meloidogyne spp.* La respuesta inducida se evaluó en 2 cultivares (tomate cv Durinta y pepino cv Dasher II). Para evaluar la posible respuesta se analizó el peso radicular, el peso aéreo y la superficie foliar. También se evaluó la infección producida por *Meloidogyne spp.*, valorando el número de masas de huevos i el número de huevos por planta que se utilizó para obtener el valor de índice de resistencia.

Los resultados sobre el crecimiento foliar y radicular no fueron significativamente diferentes. Si que se observaron valores significativos en el número de huevos y el número de masas de huevos por planta, incrementando respecto el control en el caso del pepino y disminuyendo en el tomate, obteniendo índices de resistencia de 3 a 0.5 en pepino y tomate respectivamente.

Palabras clave: *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma spp.*, inducción de respuesta.

**ROOT FUNGAL ENDOPHYTES CAPACITY TO INDUCE A SYSTEMIC RESPONSE OVER
Meloidogyne spp. IN SOLANACEAE AND CUCURBITACEA CROPS**

Author: **Pocurull Domènech, Míriam**

Tutor: **Sorribas Royo, Francesc Xavier**

SUMMARY

Phytoparasitic nematodes of genus *Meloidogyne spp.* are the cause of a very important loss in horticultural production. The natural presence in soil of endophyte fungus with capacity to induce a response in the plant towards the pathogen is a not yet well studied subject.

In the current dissertation, the endophytic capacity of 6 isolated forms of *Pochonia chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2, S2_C5, S2_H8, S1_H7 i S1_H6) were been evaluated within 3 cultures liable to the nematode susceptible (tomato cv Durinta, cucumber cv Dasher II and melon cv Paloma). The endophytic capacity value of the isolated forms was of between 5 and 88% without regarding any difference between the cultivars and the isolated one or between the isolated ones towards the cultivar. At the same time, the capacity of the isolated forms of parasitism of eggs and juveniles of *Meloidogyne spp.* was evaluated. The different isolated forms parasitized between 23 and 89% of the eggs besides the values of parasitism of the juveniles which were lower and do no differ between the isolated forms.

At the same time, "Split root" system was used in order to evaluate the systemic response inductions of 3 isolated forms of *P. chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2 i S2_C5) and 2 isolated ones of *Trichoderma spp.* (T22 i T34) for *Meloidogyne spp.* The induced response was evaluated in 2 cultivars (tomato cv Durinta and cucumber cv Dasher II). In order to evaluate a feasible response, it was analysed the root weight, dry aerial weight and the aerial area. It was also analyzed the infection caused by *Meloidogyne spp.*, evaluating the amount of egg masses and the amount of eggs for plant that were used to obtain the value of the resistance index.

The result of the foliar and radicular growth were not sustainable different. Whereas, it was observed significant values in the number of eggs and the masses of egg for each plant. The values increase regarding the control in the cucumber case and decreasing in the tomato, obtaining a residence index of 3 and 0,5 in cucumber and tomato, respectively.

Key words: *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma spp.*, response induction.

AGRAÏMENTS

Agrair a qui m'ha donat la possibilitat de desenvolupar aquest treball, al Xavier, per haver confiat en mi i haver-me ajudat i animat en tota aquesta fase d'aprenentatge.

A la gent que ha coincidit amb mi durant aquest període de temps, sobretot a l'Ari, per estar allà en tot moment de forma presencial o a la distància i per poder comptar amb ella en qualsevol moment, tant a dins com a fora del laboratori.

A la resta d'habitants de l'ESAB, en especial, la Sheila, la Maria, l'Adriana i la Zahra, les quals en algun moment han col·laborat en aquest projecte.

Per altra banda agrair a la Isabel Trillas per proporcionar el T34, a la Magda Galeano pel T22 i a Fitó pel meló cv Paloma.

ÍNDIX

1.	INTRODUCCIÓ.....	7
-	Els nematodes	7
-	Els mecanismes de resistència	9
2.	OBJECTIUS	13
3.	MATERIALS I MÈTODES	15
3.1	Valoració de la capacitat endofítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en el tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma.	15
3.2	Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en ous de <i>Meloidogyne</i> spp.	17
3.3	Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en juvenils de <i>Meloidogyne</i> spp.	18
3.4	Valoració de la possible inducció de resposta sistèmica pels fongs envers <i>Meloidogyne</i> spp.	19
-	Índex de resistència.....	24
4	RESULTATS.....	26
4.1	Valoració de la capacitat endofítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en el tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma.	26
4.2	Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en ous de <i>Meloidogyne</i> spp.	26
4.3	Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en juvenils de <i>Meloidogyne</i> spp.	27
4.4	Valoració de la possible inducció de resistències pels fongs vers <i>Meloidogyne</i> spp.	27
5	DISCUSIÓ	36
6	CONCLUSIONS	39
7	BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUCCIÓ

Espanya juntament amb Itàlia es un dels principals productors europeu d'hortalisses, principalment de solanàcies (tomàquet, pebrot i albergínia) i cucurbitàcies (cogombre, meló, síndria i carbassó) sota coberta (FAO, 2002). Els nematodes són una plaga que té una incidència molt important en aquets cultius, causant pèrdues econòmiques significatives. S'han estimat pèrdues màximes de producció causades per *Meloidogyne* en tomàquet, cogombre, carbassó i síndria en hivernacle del 60%, 88%, 80% i 34% respectivament (Verdejo-Lucas et al. 1994; Ornat et al., 1997; Sorribas et al 2005).

Actualment ens trobem amb la necessitat de desenvolupar nous sistemes de control més respectuosos amb el medi, degut a la prohibició de moltes substàncies químiques i la implantació de la gestió integrada de plagues, la qual fonamenta l'ús de mètodes de regulació natural de plagues i l'ús racional de productes fitosanitaris.

- Els nematodes

El Phylum Nematoda es un dels grup d'animals més diversos del mon, compost per unes 25000 spp conegudes, però es creu que encara en queda un número molt superior per descobrir. Es poden trobar en hàbitats molt diversos, ocupant una gran diversitat d'ecosistemes.

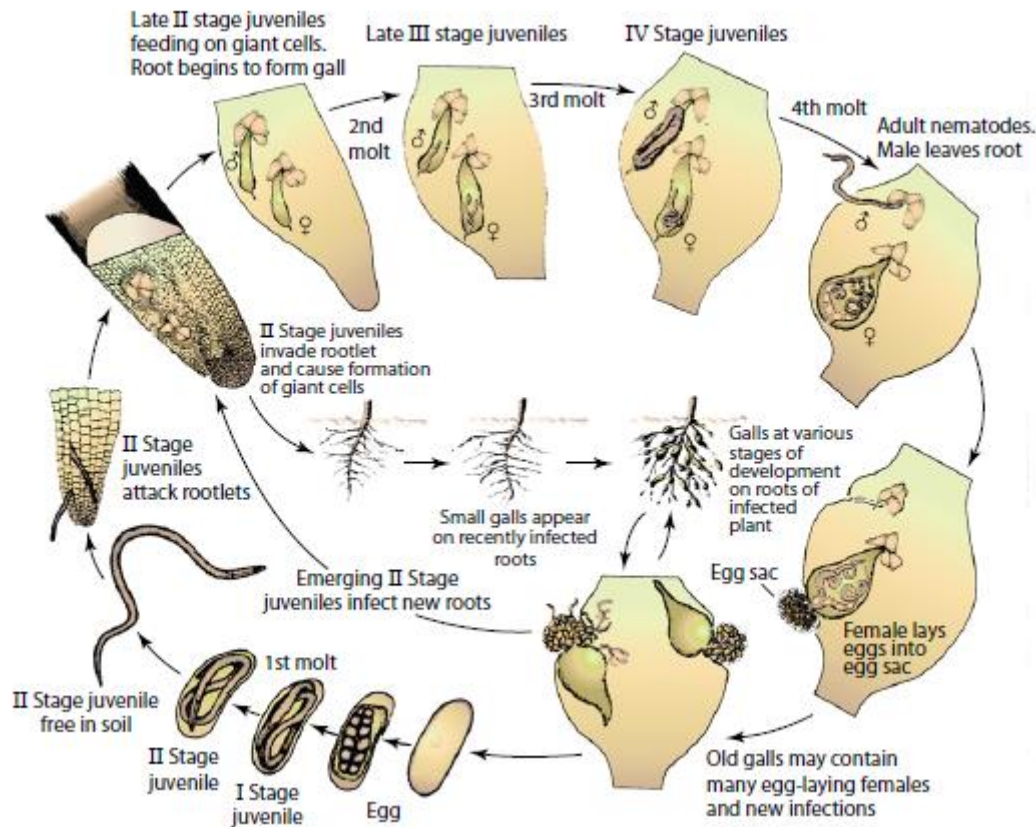
Els nematodes fitoparàsits acostumen a viure al sòl. Són paràsits obligats de les plantes, majoritàriament obtenen l'aliment de les parts subterrànies, però en algun cas també poden obtenir-lo d'òrgans aeris com tiges, fulles i flors (Agrios , 2005). Tots els nematodes fitoparàsits es caracteritzen per la presència d'un estilet, el qual els permet obtenir l'aliment, i en alguns casos penetrar els teixits de la planta. Els símptomes causants en les plantes són inespecífics i semblants als causants per altres agents patògens, siguin biòtics o abiòtics, pel que es necessari la utilització de tècniques de diagnòstic per a esbrinar l'agent causant de la malaltia. Els nematodes poden causar símptomes a conseqüència directa de la seva activitat (nòduls a les arrels, necrosis a la part radicular o a la part aèria, deformacions a les tiges, als fruits, etc.), o indirectament a conseqüència de la interacció amb altres agents patògens, com fongs, bacteris o virus (Castillo i Verdejo-Lucas, 2011) .

Els nematodes endoparàsits sedentaris es poden classificar en dos grans grups, els nematodes formadors de nòduls i els nematodes de quist. Els formadors de nòduls es caracteritzen per la

capacitat de causar nodulacions a la zona radicular, on destaca el gènere *Meloidogyne*. En els formadors de quist les femelles retenen els ous dins del cos i endureixen la cutícula a mida que envelleixen, formant el quist que els hi permet suportar les condicions ambientals adverses, on destaquem els gèneres *Globodera* i *Heterodera* (Bello et al., 1994).

El gènere *Meloidogyne*, és el principal nematode limitant de la producció d'hortalisses, estimant en un 30% les pèrdues que causa a nivell mundial (Netscher i Sikora, 1990). A Catalunya, les pèrdues de producció registrades en tomàquet i enciam van ser del 36% i del 61% en tomàquet de cicle curt i en cogombre (Ornat i Sorribas, 2008). Les espècies més freqüents són: *Meloidogyne arenària*, *M. incògnita*, i *M. Javanica*.

Meloidogyne spp. és un nematode endoparàsit sedentari, amb reproducció partenogenètica. El cicle de vida del nematode comprèn 6 estadis de desenvolupament, tal i com observem a la imatge 1: Ou, 4 estadis juvenils (J_1 - J_4) i adult. En absència de planta hoste sobreviu en forma d'ou i de juvenil de segon estadi (J_2) de forma lliure al sòl. L'estadi de forma lliure (J_2), serà el qual penetrarà a l'arrel de la planta hoste i s'establirà en un lloc permanent d'alimentació, transformant-se en un nematode sedentari. L'establiment del lloc permanent d'alimentació causa la producció de cèl·lules gegants al voltant de la zona de fixació, incrementant el nombre d'òrgans cel·lulars i la seva activitat metabòlica. En condicions favorable els J_2 muden 3 vegades, passant per les fases J_3 , J_4 fins a femella, que produeixen un gran nombre d'ous dins una matriu gelatinosa, que protegeix els ous de les condicions ambientals adverses, de la predació i del parasitisme. La massa d'ous es localitza a la superfície radicular o en l'interior de les agalles. La majoria d'ous evolucionen a juvenils de primer estadi i muden posteriorment a juvenils de segon estadi (J_2), emergint de l'ou i tornant a tenir capacitat d'infecció, penetrant les arrels i tornant a iniciar el cicle (Taylor i Sasser, 1978). Els juvenils només evolucionaran a mascle en condicions adverses. No hi ha evidències que els mascles s'alimentin de la planta, pel que són un mecanisme de regulació de la població per disminuir la competència interespecífica.



Imatge 1: Cicle del *Meloidogyne* spp. Font: Agrios, G., (2005) *Plant Pathology* 5th.

Meloidogyne es una animal poiquiloterm, es a dir, la temperatura té un efecte directe en la seva taxa de desenvolupament. El nombre de generacions completades, la taxa de desenvolupament i les pèrdues de producció del cultiu, tindrà una relació directa amb els graus dia acumulats per sobre d'una temperatura base. Els requeriments de graus acumulats i la temperatura base variaran segons el cultiu i l'espècie del nematode (Ferris 1985 i Giné, et al. 2014).

- Els mecanismes de resistència

El mètode principal de control de *Meloidogyne* és el químic (Talavera et al., 2012). La tendència actual de la producció agrícola ens porta a buscar estratègies de control alternatives al control químic degut a la prohibició dels nematicides de síntesi en agricultura ecològica i la reducció de l'ús d'aquests en producció integrada, pel seu efecte sobre la fauna auxiliar. Vers aquestes limitacions es necessari desenvolupar noves formes de control, donant prioritat als elements de regulació naturals, per intentar mantenir els nivells de densitat de població per

sota del llinda de dany econòmic. Entre els mètodes alternatius considerem la resistència vegetal i el control biològic.

La resistència vegetal pot ser de naturalesa genètica o induïda.

En el cas de control de nematodes la resistència genètica pot anar associada a la existència de cultivars portadors del gen(s) R o be de portaempelts. En tomàquet, la resistència es conferida pel gen Mi-1, el qual s'expressa front les principals espècies de nematodes fitoparàsits (*M.arenaria*, *M.javanica* i *M.incognita*) (Sorribas y Verdejo-Lucas, 1994; Ornat y Sorribas, 2008; Talavera et al., 2012)

La resistència induïda per agents biòtics, s'entén com l'activació de mecanismes de defensa de la planta a partir d'estímuls d'aquets agents, sense comptar amb la presència de gens R. La inducció de resistències està regulada, principalment, per tres tipus de senyals i hormones: salicílic (SA), jasmònic (JA) i etilè (ET) (Pieterse et al., 2009). Les vies de senyalització es relacionen entre elles amb una interacció sinèrgica (JA i ET) i d'antagonisme (SA i JA/ET) (Doherty, et. al. 1988), permetent adaptar els mecanismes de defensa a l'agent inductor de la resistència. Generalment la via SA s'activa front a agents biòtrofs (Glazebrook, 2005) i la via JA front els agent necrotròfics i insectes herbívors (Bostock et al., 2005), tot i que es presenten excepcions, com l'activació de SA pels insectes perforadors o xupadors, com moques blanques, àfids o àcars, i possiblement algun nematode, pel dany limitat als teixits i la prolongada interacció amb les cèl·lules de la planta (Kaloshian, 2004).

Les vies de senyalització de resistència induïda front a nematodes es poc coneguda, la informació es parcial i en alguns casos contradictòria. Fudali et al (2013) senyala la importància de la via ET per modular l'atracció de *Meloidogyne* a l'hoste, mentre que altres autors consideren la via SA la responsable d'induir resistència (Owen et al., 2002; Nandi et al., 2003; Branch et al., 2004) i altres per la via JA (Bhattarai et al., 2008; Nahar et al ., 2011). Existeixen evidències de l'activació de la via JA per part dels fongs endofítics (Ren i Dai, 2012), alguns dels quals són capaços d'induir respostes front els nematode (Yan et al. 2011). Els fongs endofítics són integrants de la comunitat microbiana del sòl i formen part de grups funcionals que poden jugar un paper determinat en la supresivitat dels sòls a malalties i patògens (Backman i Sickora, 2008).

L'ús de resistències vegetals pel control de nematodes és una tècnica efectiva i econòmicament rentable (Sorribas et al., 2005), que redueix la taxa de creixement de la població, donant lloc a una menor densitat de formes infectives al sòl, causant una reducció important de les pèrdues de producció del següent cultiu (Ornat et al., 1997). El nivell de

resistència expressat per portaempelts amb gens R és molt variable segons el nematode i el genotip vegetal, arribant a ser susceptibles. A més, l'ús reiterat d'aquets portaempelts (2 o 3 cultius consecutius) pot seleccionar poblacions virulents capaces de trencar la resistència (Verdejo-Lucas et al., 2009).

L'estratègia ideal a seguir seria realitzar rotacions de cultius portadors de gens R de resistència o buscar agents que indueixin mecanismes de defensa de la planta en genotips no portadors dels gens de resistència.

A l'actualitat es disposa de pocs gens de resistència fixats als cultivars comercials d'espècies hortícoles: el gen Mi-1 en tomàquet i el Me1 i el Me3-M7(d'un sol al·lel) en pebrot. Els dos cultius pertanyen a la mateixa família i totes dues es conreen pels fruits, pel que no és aconsellable conrear-los en rotació per a preservar la fertilitat fisicoquímica i biològica del sòl. Aquest fet obliga a buscar germoplasma resistent en altres espècies vegetals per poder realitzar rotacions amb cultivars de diferents famílies i diferent aprofitament.

És probable que l'alternança de la resistència conferida per gens R front a nematodes amb la resistència induïda per fongs endòfits en plantes sense gens R, permeti mantenir densitats de poblacions de nematodes inferiors a les que causen danys econòmics i així preservar la durabilitat de les resistències evitant la selecció de poblacions virulentes. A més, si aquets fongs tenen capacitat de parasitar estadis de desenvolupament del nematode (Sorribas et al., 2003; Verdejo_Lucas et al., 2003; Maciá-Vicente et al., 2009), causaran una reducció addicional de la població.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

- Valorar la capacitat endofítica de fongs seleccions en cogombre cv Dasher II, en tomàquet cv Durinta i en el meló cv Paloma.
- Valorar la capacitat parasitaria d'ous de *Meloidogyne spp.* pels fongs seleccionats.
- Valorar la capacitat parasitaria de juvenils de *Meloidogyne spp.* pels fongs seleccionats.
- Valorar la capacitat dels fongs seleccionats per induir respostes sistèmiques vers *Meloidogyne spp.* en tomàquet i cogombre.

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

Els fongs utilitzats per a realitzar el present treball van ser diferents aïllats de *Pochonia chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2, S2_C5, S2_H8, S1_H7 i S1_H6) procedents de la col·lecció de fongs aïllats d'ous de *Meloidogyne spp.* de dues parcel·les de producció hortícola ecològica (Giné et al., 2012) i dos aïllats comercials de *Trichoderma asperellum* (T34) i *Trichoderma harzianum* (T22).

Respecte el material vegetal usat treballarem amb el tomàquet cv Durinta, el cogombre cv Dasher II i el meló cv Paloma.

3.1 Valoració de la capacitat endofítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en el tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma.

Tots els aïllats fúngics es van sembrar en 5 plaques de PDA (39g Patata Dextrosa Agar /L d'aigua) per a obtenir suficient font d'inòcul per la realització dels experiments, conservats en una càmera de creixement a 25°C a les fosques.

Les llavors de tomàquet cv Durinta, el cogombre cv Dasher II i el meló cv Paloma es van esterilitzar en una solució de lleixiu comercial (35 g/l de clor actiu) al 50% durant 2 minuts amb agitació constant. Posteriorment es van realitzar 3 rentats amb aigua destil·lada estèril per treure l'excés de lleixiu, seguidament amb paper absorbent es va retirar l'excés d'aigua. Les llavors, un cop esterilitzades, es van dipositar en una superfície d'agar-aigua (15g d'agar/L d'aigua) contingut en una càpsula de Petri de 9 cm de diàmetre. Tot aquest procediment es va realitzar en una cambra de flux laminar per mantenir les condicions d'esterilitat. Les llavors es van mantenir a una cambra climàtica a 25°C, a les fosques, fins obtenir plàntules amb una longitud de radícula aproximada de 3 cm.

Segons el cultivar, la velocitat de creixement varia. En tomàquet cv Durinta i el meló cv Paloma van assolir aproximadament els 3 cm a les 96 hores posteriors a la sembra de la llavor en placa, mentre que el cogombre cv Dasher II es van assolir a les 72.

Un cop assolida aquesta longitud radícula, es van transferir plàntules a l'interior de les plaques on els aïllats fúngics ocupaven el 75% de la placa. La radícula es va posar en contacte amb el fong tot evitant fer qualsevol ferida a la plàntula, es van posar 5 plàntules per placa, que

facilités la penetració del fong i es va mantenir durant 72 hores, mantenint les mateixes condicions usades per al creixement del fong.

Es van retirar les plàntules i es va procedir a esterilitzar la radícula. Segments d'uns 2 centímetres aproximadament es van submergir en una solució de lleixiu comercial al 50% i es va procedir com s'ha descrit anteriorment en el protocol d'esterilització de llavors.

Plaques de Petri amb PDA de 9cm, es van dividir en dues parts. En una de les parts es va realitzar un *imprint*, és a dir, es va col·locar l'arrel esterilitzada damunt del medi durant 10 segons per a comprovar l'esterilització externa de l'arrel. Un cop transcorreguts els 10 segons es va agafar el fragment d'arrel i es va transferir a l'altra meitat de placa per determinar si hi havia creixement, les plaques es van mantenir a 25°C i foscor. L'avaluació es va fer periòdicament durant 3 setmanes.

Per comprovar l'esterilització de l'arrel es valorarà de la següent manera. El creixement en l'*imprint* i el creixement des de l'interior de l'arrel. En els casos que es va observar creixement en l'*imprint*, es va concloure que no s'havia realitzat una correcta esterilització de l'arrel i es descartava, ja que no es podia valorar si el creixement observat en l'arrel procedia d'estructures fúngiques a l'interior radicular o d'adherides a la paret radicular. En el cas que no es va observar creixement en l'*imprint* però si que es va observar creixement des de l'interior radicular, es va considerar que el fong era endòfit. Finalment, si no s'observava creixement ni a l'*imprint* ni a l'arrel, es considerava que el fong no era endòfit, tal i com podem veure a la imatge 2.



Imatge 2: Repetició de l'assaig d'endofitisme Pochonia chlamydosporia en meló cv Paloma. A l'esquerra observem una positiu per endofitisme i a la dreta un negatiu.

L'assaig es va repetir 2 vegades. Cada vegada la combinació fong cultivar 10 vegades.

Anàlisi de resultats

L'anàlisi de resultats es va realitzar mitjançant el programari SAS. Es va realitzar un anàlisi de variàncies mitjançant el test estadístic ANOVA (≤ 0.05).

3.2 Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en ous de *Meloidogyne* spp.

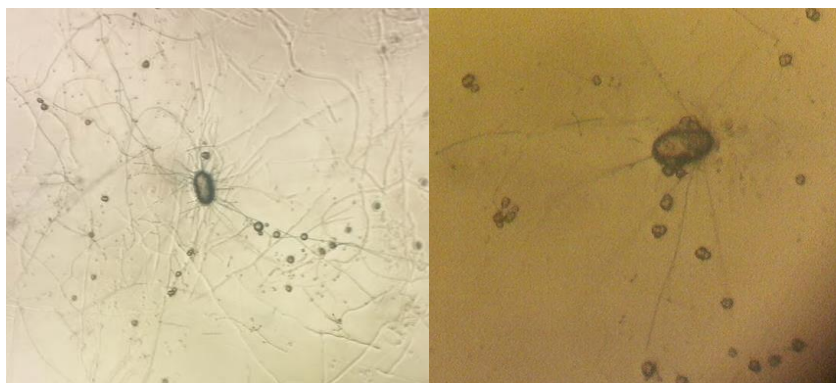
Una setmana abans de l'inici de l'assaig es van sembrar els aïllats fúngics en agar-aigua, els quals es van conservar a 25°C a les fosques.

Els ous de *Meloidogyne* spp. es van obtenir a partir de masses d'ous produïdes en arrels infectades pel nematode. Es van extreure i es van transferir a aigua destil·lada i es va netejar la capa gelatinosa superficial per tal de facilitar l'esterilització dels ous. Cinc masses d'ous es van introduir en un tub cònic de centrifuga que contenia un ml de solució de lleixiu comercial al 10%. És va mantenir durant 4 minuts amb agitació cada 30 segons. Un cop transcorregut el temps, la suspensió es va diluir 10 vegades amb aigua destil·lada estèril i es va deixar reposar el tub cònic durant 30 minuts, per aconseguir que els ous esterilitzats precipitessin.

Del fons del tub cònic i amb l'ajut d'una Pipeta Pasteur, es van pipetejar els ous i es van transferir al voltant de la colònia de aïllat d'una setmana d'edat. A cada placa es van transferir entre 30 i 50 ous. Tot aquest procés es va realitzar en una cambra de flux laminar i amb el material emprat degudament esterilitzat, per mantenir les condicions d'esterilitat i evitar contaminacions.

Es va mantenir les plaques en una cambra de creixement, mantenint les condicions en que s'havia conservat la placa previ a la inoculació. Fins que el fong creixés per damunt de la zona on es van depositar els ous. Es va considerar que l'ou estava parasitat si s'apreciava hifes dins l'ou, tal i com podem observar a la imatge 3.

De cada fong es van realitzar 3 repeticions.



Imatge 3: Imatge d'ous de Meloidogyne parasitat per Pochonia chlamydosporia.

Anàlisi de resultats

Es va comparar la igualtat de variàncies mitjançant el test estadístic ANOVA (≤ 0.05) i es realitzà contrast de mitjanes mitjançant la prova mínima de diferències significativa, LSD.

3.3 Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en juvenils de *Meloidogyne* spp.

La preparació de les plaques dels fongs va ser idèntica a la que s'ha realitzat per avaluar el nivell de parasitisme dels ous.

Es va seleccionar una dissolució de juvenils de segon estadi (J_2) de *Meloidogyne*, a una concentració de 200 J_2 en 500 μ l. Els J_2 es van obtenir a partir d'ous procedents d'arrels de tomàquet. L'extracció d'ous es va fer a partir d'arrels tallades en segments d'aproximadament de 0,5 cm i van ser macerats en una solució de lleixiu comercial al 5% que seguidament es va triturar 3 vegades i es va deixar reposar durant 10 minuts. La suspensió es va passar un sedàs de 100 mesh i de 200 mesh per retirar les restes vegetals, i la solució obtinguda es va fer passar per un sedàs de 500 mesh (Hussey & Barker, 1973), que va retenir els ous. Un cop recollits es van dipositar en una safata Baerman (Whitehead i Hemming, 1965). A les 24 hores es van recollir els J_2 i es van descartar. A partir d'aquest moment i cada 24 hores es van recollir els J_2 , que es van mantenir a 5°C fins aconseguir la quantitat necessària per fer l'assaig.

La suspensió de J_2 es va transferir en un tub cònic de centrífuga on vam afegir 500 μ l d'estreptomicina al 0.1%. La solució es va mantenir durant 4 hores realitzant agitacions constants. Un cop passades les 4 hores es va diluir 10 vegades, i es va deixar reposar durant 30 minuts perquè els J_2 precipitin.

El procés de col·locar el J₂ a l'interior de la placa on estava creixent el fong va ser el mateix que es va realitzar en l'assaig de parasitisme d'ous. A cada placa es van transferir entre 50 i 100 J₂. Un cop el fong va créixer per sobre de la zona on es van depositar els J₂, es va valorar el percentatge de juvenils que havien estat parasitats amb l'ajut d'una lupa respecte el total de J₂.

L'assaig es van realitzar 3 repeticions de cada aïllat fúngic.

Anàlisi de resultats

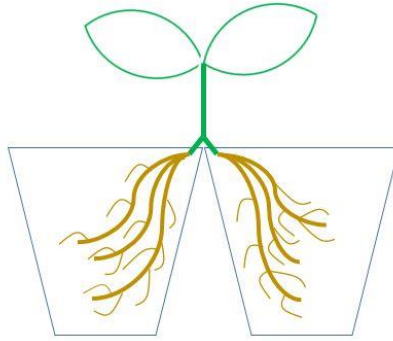
No es va realitzar cap tractament estadístic ja que tenim valors iguals a 0.

3.4 Valoració de la possible inducció de resposta sistèmica pels fongs envers *Meloidogyne spp.*

L'experiment es va fer amb el tomàquet cv Durinta i el cogombre cv Dasher II. Els aïllats fúngics seleccionats van ser: 3 *Pochonia chlamydosporia* (S1_C1, S2_C2 i S2_C5) i dos *Trichoderma spp.* comercials (T22 i T34).

Les llavors de tomàquet i cogombre es van sembrar en vermiculita esterilitzada continguda en una safata i saturada d'aigua, i en l'interior d'una bossa de plàstic. Aquesta safata es va mantenir en una cambra de creixement a 24°C. Un cop germinades es va tallar la part apical de la radícula i les llavors es van traspasar a una safata alveolada amb vermiculita esterilitzada. Aquí es va mantenir fins que es va observar la presència de la primera fulla verdadera. En el cas del cogombre va trigar 2 setmanes i 3 en tomàquet.

Paral·lelament es van preparar pots de 200 cm³ de capacitat on es van trasplantar les plantes per tal de dur a terme el sistema "Split Root", tal i com es descriu en estudis previs (Adam et al., 2014; Schaarschmidt et al., 2013). Aquests contenien sorra esterilitzada i estaven units com es pot observar a la imatge 4. El contenidor conegut com "inducer", va ser inoculat amb el fong i l'altre anomenat "responder" on es va inocular el nematode. Això va comportar que al treure la planta amb la primera fulla verdadera de la safata alveolada es dividís l'arrel en dos segments i es col·loquessin un a cada contenidor, com podem observar a la imatge 4. És a dir, cada tenia l'arrel dividida en dos i cada part plantada en contenidors individuals.



Imatge 4: Sistema "split root". Tractament control.

Respecte el sistema d'inoculació dels fongs vam realitzar dos procediments diferents, un pel cogombre i un pel tomàquet.

En el cas de cogombre vam obtenir la suspensió de clamidospores (espores pluricel·lulars de resistència de la *Pochonia chlamydosporia*) mitjançant un raspall de la colònia fúngica crescudes en plaques de petri amb PDA, posteriorment es va rentar amb aigua esterilitzada per recollir la suspensió amb una pipeta. El recompte de clamidospores es va realitzar en una cambra de Neubauer. Dos setmanes posteriors al trasplantament es va inocular el fong amb una densitat de clamidòspores de l'ordre del 10^5 en el contenidor "inducer" i una setmana després vam inocular 200 J₂ al contenidor "responder", és a dir, a una relació de 1 J₂/cm³.

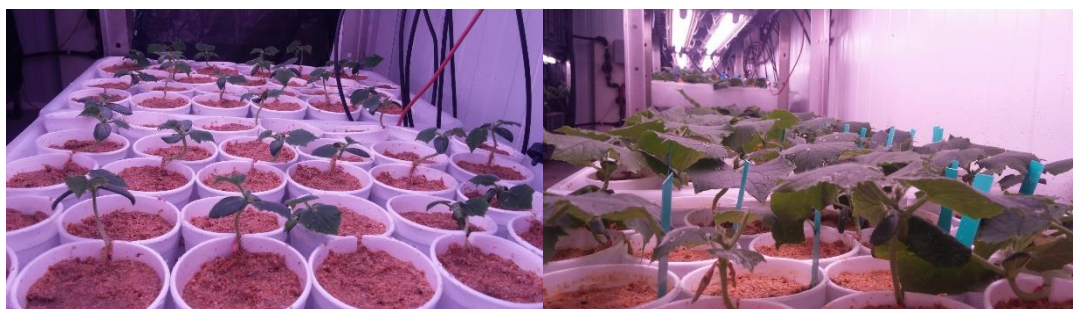
En el cas del tomàquet els aïllats de *P. chlamydosporia* es va multiplicar en ordi hidratat i esterilitzat en Erlenmeyers, seguint el protocol de Becerra Lopez Lavallo et al., (2012). Els Erlenmeyers es van agitar diàriament per evitar compactacions i potenciar un creixement més homogeni del fong. Un cop desenvolupat, tal i com s'observa a la imatge 5, es va molturar el gra i es va realitzar una suspensió, en la qual es va avaluar la densitat de clamidospores mitjançant la cambra de Neubauer. En aquest cas la inoculació en el "inducer" es va realitzar introduint el pes del blat que corresponia a la densitat de clamidospores desitjada en el moment de realitzar la inducció del "split root" i la inoculació dels 200 J₂ es va realitzar a les 3 setmanes del trasplantament, al contenidor destinat al "responder".



Imatge 5: Fotografia a la cambra de creixement.

En el cas dels *Trichoderma* al tractar-se d'uns preparats comercials vam procedir a inocular amb la quantitat de format que contenia de l'ordre de 10^5 UFC, tant en el cogombre com el tomàquet.

La temperatura del sòl va ser registrada mitjançant unes sondes ATICO a intervals de 30 minuts.



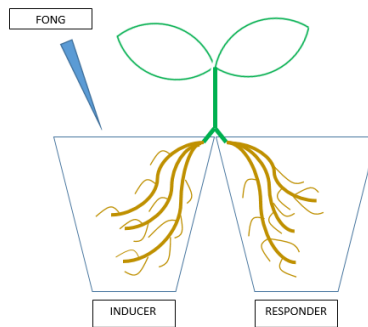
Imatge 6: Assaig del cogombre cv Dasher II a la cambra de creixement.



Imatge 7: Assaig del tomàquet cv Durinta a la cambra de creixement.

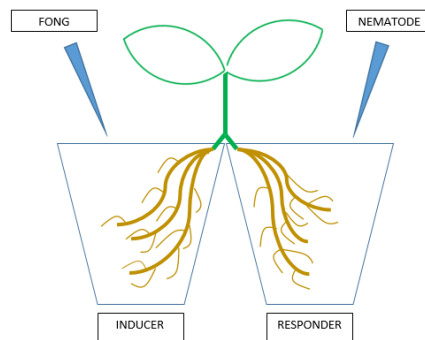
Els tractaments assajats van ser:

- a) Control: En el qual no vam inocular fong al “inducer” ni nematode al “responder”, imatge 4.
- b) Fong: Es va inocular el fong al “inducer”, imatge 8.



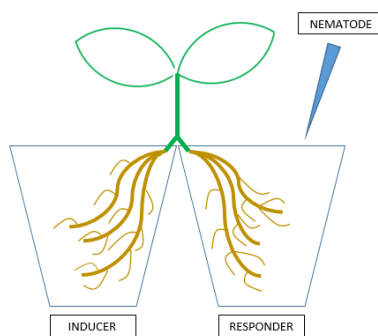
Imatge 8: Tractament on s'ha inoculat fong al "inducer".

- c) Fong + Nematode: Es va inocular el fong al “inducer” i el nematode al “responder”, imatge 9.



Imatge 9: Tractament on s'ha inoculat fong al "inducer" i nematode al "responder".

- d) Nematode: Es va inocular el nematode al “responder”, imatge 10.



Imatge 10: Tractament on s'ha inoculat nematode al "responder".

Cada combinació cultiu-aïllat va ser repetida 10 vegades, en la majoria dels tractaments.

Les plantes es van conservar a la cambra de creixement, a 25°C i una relació de 16:8 hores (llum:foscor) amb una fertilització amb solució Hoagland a demanda, fins assolir una generació en la població del nematode, segons els requeriments tèrmics, tal i com podem observar a la imatge 6 i 7.

Per tal de saber en quin moment es va completar una generació de nematodes, es van utilitzar els models fenològics descrits per a tomàquet (Ferris 1985) i en cogombre (Giné, et al. 2014). El quals ens defineixen la temperatura base i els graus dia acumulats, tal i com s'observa a la taula 1. Els valors de temperatura del sòl van ser registrats, cada hora, mitjançant uns sensors de temperatura col·locats dins de 5 contenidors.

Tomàquet :

Taula 1: Valors de la temperatura base i graus dia del tomàquet i del cogombre.

	Temperatura base	Graus dia
Tomàquet	10°C	600-700
Cogombre	11.4°C	500

En finalitzar l'assaig es va procedir a separar la part aèria de la radicular, i es van avaluar els resultats.

- **Valoració del sistema radicular**

Es van netejar les arrels, es van deixar assecar a l'aire i es van pesar.

- **Valoració dels tractaments només amb “inducer”**

Es va valorar el sistema radicular, seguin els passos descrits anteriorment i la part aèria.

Per valorar la part aèria. Es van tallar les fulles de part aèria amb els seus respectiu pecíols. Amb elles, es va calcular la superfície foliar total de la planta amb un lector de superfícies (LI-3100 AREA METER (LI-COR inc., Lincoln, Nebraska, USA)). Un cop mesurada la superfície foliar, es va valorar el pes sec de la part aèria de cada planta. col·locant-la en una estufa a 70 °C durant 48h.

- **Valoració tractaments amb “inducer” i “responder”**

Es va valorar la part aèria com s'ha descrit anteriorment.

- **Valoració masses d'ou**

El recompte de masses d'ou es va realitzar mitjançant una tinció amb erioglaucina al 0.01% durant 30 minuts (Omwege et al., 1988) la qual tenyeix de color blau la gelatina que compon les masses d'ou.

- **Recompte de la densitat d'ous per arrel**

De cada planta de forma individualitzada.

Segons el mètode de Hussey & Barher, (1973), explicat anteriorment per l'obtenció de juvenil del nematode però amb la diferència que la maceració es realitza amb dissolució de lleixiu comercial al 10%. La suspensió d'ous recollida en el sedàs de 500 mesh, es va recollir en un vial amb l'ajut d'una flascó rentador (Hussey & Barher, 1973). La suspensió d'ous recollida als vials va ser homogeneïtzada, se'n va agafar 2 ml els quals es van col·locar en una cambra de Hawksley, per realitzar el recompte d'ous.

- **Valoració dels tractaments control, amb nematodes i sense nematodes**

Amb aquest tractaments només valorarem les diferències en pes sec aeri i superfície foliar.

- **Índex de resistència**

L'índex de resistència, és la relació entre el número d'ous respecte el número d'ous del tractament amb només nematodes.

Anàlisi de resultats

Per la comprovació de la igualtat de variàncies es va utilitzar el test de Fisher i per comprovar la igualtat de mitjanes la prova t-student.

Es va comparar la igualtat de variàncies de totes les variables estudiades mitjançant el test estadístic ANOVA (≤ 0.05). Vam usar el test de Dunnett per comparar els diferents aïllats respecte el control i es realitzà el contrast de mitjanes mitjançant la prova mínima de diferències significativa, LSD.

4 RESULTATS

4.1 Valoració de la capacitat endofítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en el tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma.

Els valors es poden observar a la taula 2. En els quals només observem diferències significatives entre els aïllats en el tomàquet, i s'observen diferències entre els diferents cultius en relació amb el mateix aïllat.

Taula 2: Endofitisme dels diferents aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en els tomàquet cv Durinta, cogombre cv Dasher II i meló cv Paloma.

	Tomàquet cv Durinta (%)	Cogombre cv Dasher II(%)	Meló cv Paloma(%)
S1_C1	80.00 ± 13.3 A a	27.27 ± 9.72 A b	13.33 ± 9.09 A b
S1_H6	14.29 ± 7.82 A ab	7.41 ± 5.14 A b	34.62 ± 9.51 A a
S1_H7	47.4 ± 11.8 A a	25.00 ± 9.03 A a	25.93 ± 8.59 A a
S2_C2	81.8 ± 12.2 AB a	28.00 ± 9.17 A b	21.43 ± 7.90 A b
S2_C5	88.24 ± 8.05 AB a	19.23 ± 7.88 A c	53.57 ± 9.60 A b
S2_H8	55.56 ± 17.6 B a	19.23 ± 7.88 A b	50.00 ± 11.50 A ab

Cada valor es la mitjana del percentatge de endofitisme ± l'error estàndard (n=18). Amb les lletres majúscules indicant les diferències entre els aïllats en cada cultiu i les minúscules indicant les diferències entre cultius per cada aïllat, segons el test ANOVA ($p \leq 0.05$).

4.2 Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en ous de *Meloidogyne* spp.

Els aïllats S1_C1, S1_H6 i S1_H7 mostren una capacitat de parasitisme significativament major ($P < 0.05$) que la resta dels aïllats, mentre que els aïllats S2_C2 i S2_C5 són els que mostren una capacitat parasítica menor ($P < 0.05$) Taula 3.

Taula 3: Percentatge de parasitisme d'ous de *Meloidogyne* spp pels diferents aïllats de *Pochonia chlamydosporia*.

	Parasitisme d'ous (%)
S1_C1	89.13 ± 3.92 A
S1_H6	82.51 ± 5.91 AB
S1_H7	76.80 ± 7.21 AB
S2_C2	36.12 ± 5.80 C
S2_C5	23.28 ± 5.26 C
S2_H8	65.06 ± 2.02 B

Cada valor es la mitjana del percentatge de parasitisme ± l'error estàndard (n=4). Sense diferències significatives segons el test ANOVA ($p \leq 0.05$). Les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.

4.3 Valoració de la capacitat parasítica dels aïllats de *Pochonia chlamydosporia* en juvenils de *Meloidogyne* spp.

Els aïllats van mostrar baixa o nula capacitat de parasitisme de juvenils sent aquestes no significatives entre ells, taula 4.

Taula 4: Percentatge de parasitisme en juvenils de *Meloidogyne* spp pels diferents aïllats de *Pochonia chlamydosporia*.

	Parasitisme J ₂ (%)
S1_C1	0.00 ± 0.00
S1_H6	0.00 ± 0.00
S1_H7	1.96 ± 1.41
S2_C2	2.38 ± 2.38
S2_C5	6.50 ± 4.79
S2_H8	0.00 ± 0.00

Cada valor es la mitjana del percentatge de parasitisme ± l'error estàndard (n=4).

4.4 Valoració de la possible inducció de resistències pels fongs vers *Meloidogyne* spp.

- Cogombre cv Dasher II
 - Valoració del sistema radicular

En el tractament control no es van observar diferències de mitjanes significatives entre els pesos dels dos segments radiculars del sistema (P<0.05). Taula 5.

Taula 5: Valors de mitjanes ± error estàndard del pes e cadascun dels segments del Split-root del tractament control en cogombre cv Dasher II.

	CONTROL
Pes radicular segment 1(g)	1.52 ± 0.15 A
Pes radicular segment 2(g)	1.52 ± 0.15 A

Cada valor es la mitjana ± l'error estàndard (n=8). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

Un cop es va observar que no havien diferències en el tractament control, es va valorar en els tractament on només hi havia “inducer”, per poder concloure si el fong tenia un efecte en el creixement radicular. Els valors es mostren a la següent taula 6.

Taula 6: Valors de mitjanes \pm error estàndard, del pesos d'arrel del segment radicular "inducer" i del segment "responder", en cogombre cv Dasher II.

	Pes radicular "Inducer"(g)	Pes radicular "Responder"(g)
S1_C1	1.73 \pm 0.27 A	1.69 \pm 0.24 A
S2_C2	1.37 \pm 0.22 A	1.57 \pm 0.21 A
S2_C5	2.18 \pm 0.31 A	2.35 \pm 0.32 A
T22	1.76 \pm 0.26 A	1.38 \pm 0.21 A
T34	1.64 \pm 0.20 A	1.51 \pm 0.22 A

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=13). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

No es van observar diferències significatives entre els pesos radiculars ($P > 0.05$).

EL total de pesos radiculars es mostra en la Taula 7.

Taula 7: Valors de mitjanes \pm error estàndard, del pesos d'arrel del pes radicular, del cogombre cv Dasher II .

	Pes radicular (g)
CONTROL	1.52 \pm 0.10
S1_C1	1.71 \pm 0.18 B
S2_C2	1.47 \pm 0.15 B
S2_C5	2.27 \pm 0.22 * A
T22	1.57 \pm 0.17 B
T34	1.57 \pm 0.15 B

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=13). Valors seguits * indiquen diferències significatives ($p \leq 0.05$) respecte el control i les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.

El pes radicular de l'aïllat S2_C5 és significativament diferent i superior del control i la resta d'aïllats ($P < 0.05$).

- Valoració dels tractaments només amb "inducer"

Respecte el pes sec no s'observen diferències significatives ($P > 0.05$) No obstant, en la superfície foliar si que s'observen diferències significatives ($P < 0.05$). Els aïllats S1_C1, S2_C5 i

T34 difereixen del control, però entre els aïllats no s'observen diferències significatives entre ells. Taula 8.

Taula 8: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri i de la superfície foliar, del cogombre cv Dasher II, pels tractaments on només hi ha "inducer".

	Pes sec aeri(g)	Superfície foliar (cm²)
CONTROL	0.86 \pm 0.09	106.90 \pm 4.04
S1_C1	0.85 \pm 0.08 A	206.7 \pm 23.10 * A
S2_C2	0.87 \pm 0.09 A	163.5 \pm 20.90 A
S2_C5	1.09 \pm 0.06 A	204.10 \pm 21.70 * A
T22	0.96 \pm 0.05 A	152.8 \pm 12.50 A
T34	0.84 \pm 0.04 A	190.60 16.00 * A

*Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=13). Valors seguits * indiquen diferències significatives ($p \leq 0.05$) respecte el control i les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.*

- Valoració tractaments amb "inducer" i "responder"

A la taula 9, on podem observar tots els paràmetres analitzats, no s'observen diferències significatives entre els pesos secs aeris dels diferents aïllats ni tampoc difereixen del control ($P > 0.05$).

No obstant, si que s'observen diferències en la superfície foliar sent els aïllats S2_C5 i T22 amb una superfície foliar significativament superior ($P < 0.05$) respecte el control, però no respecte els altres aïllats.

En les variables relacionades amb la infecció de nematodes, en el número d'ous per planta observem diferències significatives segons el test ANOVA ($p \leq 0.05$) i tots els aïllats difereixen significativament respecte el control segons el test Dunnett, però no difereixen entre ells segons el mètode de separació de mitjanes LSD. Les mitjanes obtingudes en tots els aïllats tenim valors molt superiors que en el control, on hi ha presència de fong hi ha significativament més ous per planta que en el control. En la variable número de masses d'ou, observem que l'únic aïllat que no difereix del control es el T34. El T22 difereix significativament del control en el número d'ous per planta i en el número de masses d'ou difereix de la resta d'aïllats, però per altra banda també diferia del control per tenir una superfície foliar significativament superior. L'aïllat de *Pochonia chlamydosporia* el qual també

tenia un diferencia significativa en la superfície foliar difereix en el número d'ous per planta i el número de masses d'ou, respecte el control, però no difereix de la resta dels aïllats.

Taula 9: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri(g), de la superfície foliar (cm²), del número de ous per planta i del número de masses d'ous per planta del cogombre cv Dasher II.

	Pes sec aeri (g)	Superfície foliar (cm²)	Ous per planta	Masses d'ous
NEMES	0.96 \pm 0.10	128.44 \pm 6.13	4028 \pm 476	19 \pm 3
S1_C1	0.93 \pm 0.13 A	198.17 \pm 23.23 A	12617 \pm 1198 * A	37 \pm 3 * B
S2_C2	1.04 \pm 0.09 A	181.65 \pm 38.39 A	11965 \pm 1289 * A	38 \pm 5 * B
S2_C5	0.80 \pm 0.11 A	217.61 \pm 24.67 * A	8647 \pm 1406 * A	34 \pm 4 * B
T22	1.09 \pm 0.18 A	234.55 \pm 7.37 * A	10621 \pm 746 * A	52 \pm 3 * A
T34	1.07 \pm 0.11 A	169.05 \pm 8.60 A	8741 \pm 1268 * A	32 \pm 4 B

*Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=9). Valors seguits * indiquen diferències significatives ($p \leq 0.05$) respecte el control i les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.*

- **Valoració dels tractaments control, amb nematodes i sense nematodes.**

No hi ha diferències entre els dos tractaments respecte pes sec ($P > 0.05$). Però si que s'observen diferències respecte la superfície foliar, sent el tractament amb nematodes el que mostra una superfície foliar més gran que el tractament control, tal i com observem a la taula 10.

Taula 10: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri i de la superfície foliar, del cogombre cv Dasher II, ens els control i el tractament només amb nematodes. Les lletres simbolitzen les diferències significatives entre els tractaments.

	Pes sec aeri (g)	Superfície foliar (cm²)
CONTROL	0.86 \pm 0.09 A	106.90 \pm 4.04 A
NEMES	0.96 \pm 0.10 A	128.44 6.13 B

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=8). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

- **Índex de resistència**

Tots els valors obtinguts, els quals es poden observar a la taula 11, són superiors a 1, el qual ens indica que en els tractaments on hi ha presència del "inducer" existeix un major número d'ous per planta respecte el número d'ous per planta del control (només nematodes).

Taula 11: Índex de resistència obtingut de la relació del número d'ous per planta dels diferents tractaments respecte els ous per planta del tractament on només hi ha nematodes, en el cogombre cv Dasher II.

	IR
S1_C1	3.13 ± 0.30
S2_C2	2.97 ± 0.32
S2_C5	2.15 ± 0.35
T22	2.64 ± 0.18
T34	2.17 ± 0.31

Cada valor es la mitjana de l'índex de resistència ± l'error estàndard (n=9).

- Tomàquet cv Durinta
 - **Valoració del sistema radicular**

No existeix diferències significatives ($P > 0.05$) entre els dos pesos radiculars obtingut del control sense tractaments (Taula 12)

Taula 12: Valors de mitjanes ± error estàndard, del pesos d'arrel d'un segment radicular vers l'altre segment, del tomàquet cv Durinta.

	CONTROL
Pes radicular segment 1	0.896 ± 0.073 A
Pes radicular segment 2	0.914 ± 0.116 A

Cada valor es la mitjana ± l'error estàndard (n=6). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

Els resultats dels pesos d'arrel dels "inducer" i els "responder" estan indicats a la taula 13. No s'observen diferències ($P > 0.05$) entre el segment radicular associat a l'"inducer" envers el segment associat al "responder". Per altra banda a la taula 14 podem veure els valors del pesos de cada tractament respecte el control. A la taula 14 tenim les diferències del conjunt radicular respecte el control.

Taula 13: Valors de mitjanes \pm error estàndard, del pesos d'arrel del segment radicular anomenat "inducer" i del segment anomenat "responder", del tomàquet cv Durinta.

	Pes radicular "Inducer"	Pes radicular "Responder"
S1_C1	0.96 \pm 0.07 A	0.76 \pm 0.09 A
S2_C2	1.09 \pm 0.08 A	1.12 \pm 0.09 A
S2_C5	1.23 \pm 0.18 A	1.13 \pm 0.23 A
T22	1.27 \pm 0.18 A	1.25 \pm 0.11 A
T34	0.84 \pm 0.18 A	0.79 \pm 0.11 A

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=8). Valors seguits de les lletres que indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.

Taula 14: Valors de mitjanes \pm error estàndard, del pesos d'arrel del pes radicular, del tomàquet cv Durinta..

	Pes radicular (g)
CONTROL	0.91 \pm 0.07
T22	1.26 \pm 0.10 A
S2_C5	1.18 \pm 0.14 AB
S2_C2	1.10 \pm 0.06 ABC
S1_C1	0.86 \pm 0.10 BC
T34	0.81 \pm 0.12 C

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=8). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

No s'observen diferències respecte el control, però si que s'observen diferències entre els diferents tractaments.

- Valoració dels tractaments només amb "inducer"

Observem que no hi ha diferències significatives ($P > 0.05$) entre mitjanes, ni pel pes sec aeri ni per la superfície foliar de les plantes de tomàquet respecte els aïllats, taula 15.

Taula 15: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri i de la superfície foliar, del tomàquet cv Durinta, pels tractaments on només hi ha "inducer"

	Pes sec (g)	Superfície foliar cm2
CONTROL	1.14 \pm 0.06	239.06 \pm 11.34
S1_C1	1.42 \pm 0.19 A	251.15 \pm 22.06 A
S2_C2	1.35 \pm 0.07 A	281.10 \pm 11.40 A
S2_C5	1.50 \pm 0.08 A	297.42 \pm 15.44 A
T22	1.53 \pm 0.06 A	299.30 \pm 18.88 A
T34	1.32 \pm 0.22 A	259.75 \pm 44.11 A

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=8). Valors seguits * indiquen diferències significatives ($p \leq 0.05$) respecte el control i les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.

- **Valoració tractaments amb “inducer” i “responder”**

El pes sec aeri dels diferents aïllats respecte el control no difereix ($P > 0.05$) encara que si que n'existeixen diferències entre els aïllats ($P < 0.05$) En aquest cas podem diferenciar dos grups, un per als aïllats S1_C1 i el T34, i l'altre grup per la resta de tractaments, sent aquest últim el que mostra un pes aeri superior a la resta

En relació a la superfície foliar tampoc tenim diferències ($P > 0.05$) respecte el control però si que difereixen significativament entre els aïllats ($P < 0.05$) En aquest cas els aïllats S2_C2, S2_C5 i T22 són els que promouen un desenvolupament foliar superior a la resta.

En el cas d'ous per planta els dos *Trichoderma spp* són significativament diferents al control ($P < 0.05$). En el moment de comparar les diferències entre els aïllats s'observa que l'aïllat S2_C2 mostra més ous per planta, però no difereix de la resta de *Pochonies*, metre que el T34 és l'aïllat que menys ous per planta, però sense diferències significatives de l'altre *Trichoderma* i de l'aïllat S1_C1. Respecte les masses d'ou el T34 i el S2_C5 difereixen significativament respecte el control. En el moment de comparar els aïllats tots ells mostren més quantitat de masses d'ous que l'aïllat T34. (Taula 16)

Taula 16: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri (g), de la superfície foliar (cm^2), del número de ous per planta i del número de masses d'ous per planta del tomàquet cv Durinta II.

	Pes sec aeri (g)	Superfície foliar (cm^2)	Ous per planta	Masses d'ous
NEMES	1.26 ± 0.09	259.41 ± 17.56	47348 ± 55	55 ± 6
S1_C1	1.02 ± 0.07 B	227.41 ± 12.68 BC	35129 ± 43 ABC	43 ± 6 A
S2_C2	1.38 ± 0.15 A	260.44 ± 15.06 AB	38942 ± 44 A	44 ± 5 A
S2_C5	1.45 ± 0.15 A	283.42 ± 17.71 A	36347 ± 37 AB	37 ± 3 * A
T22	1.45 ± 0.09 A	299.56 ± 16.38 A	24593 ± 36 * BC	36 ± 5 A
T34	0.99 ± 0.08 B	201.52 ± 10.71 C	21839 ± 16 * C	16 ± 3 *B

Cada valor es la mitjana del percentatge de parasitisme \pm l'error estàndard ($n=10$). Valors seguits * indiquen diferències significatives ($p \leq 0.05$) respecte el control i les lletres indiquen les diferències significatives entre grups segons el test de LSD.

- **Valoració dels tractaments control, amb nematodes i sense nematodes**

No existeixen diferències significatives entre el control sense cap aïllat inoculat i el control en el qual nomes hi ha nematodes ($P > 0.05$) (Taula 17).

Taula 17: Valors de mitjanes \pm errors estàndard, del pes sec aeri i de la superfície foliar, del tomàquet cv Durinta, del control i el tractament només amb nematodes. Les lletres simbolitzen les diferències significatives entre els tractaments, segons el segons el test LSD.

	Pes sec aeri (g)	Superfície foliar (cm ²)
CONTROL	1.14 \pm 0.06 A	239.06 \pm 11.34 A
NEMES	1.26 \pm 0.09 A	259.41 17.56 A

Cada valor es la mitjana \pm l'error estàndard (n=6). Les lletres simbolitzen la igualtat de mitjanes.

- Índex de resistència

L'índex de resistència per el tomàquet cv Durinta respecte els diferents aïllats s'observa en la taula 18.

Taula 18: Índex de resistència obtingut de la relació del número d'ous per planta dels diferents tractaments respecte els ous per planta del tractament on només hi ha nematodes, en el tomàquet cv Durinta II.

	IR
S1_C1	0.74 \pm 0.11
S2_C2	0.82 \pm 0.12
S2_C5	0.77 \pm 0.07
T22	0.52 \pm 0.06
T34	0.46 \pm 0.10

Cada valor es la mitjana de l'índex de resistència \pm l'error estàndard (n=10).

En aquest cas es pot observar que els valors obtinguts són inferiors a 1, això ens indica que en el cas de tomàquet els aïllats tenen un número d'ous inferior respecte el número d'ous per planta del control.

5 DISCUSIÓ

Tots els fongs avaluats tenen capacitat endofítica i no observem cap diferència significativa entre aïllats respecte el cultiu o entre cultius en relació als aïllats. En condicions reals la interacció entre el conjunts d'aïllats que componen el sòl i les diferents rotacions de cultius, condicionen la dinàmica entre els conjunt d'aïllats presents, tenint en compte que tant la *Pochonia* com el *Trichoderma* tenen un component saprofític, els quals poden sobreviure amb la matèria orgànica present al sòl. Per altra banda coneixent la capacitat parasítica dels aïllats de *Pochonia* crea un valor afegit en el sistema de control biològic, ja que a part d'induir una resposta causa una disminució de la població.

La utilització del sistema “*Split root*” (Schaarschmidt et al., 2013) ens permet confirmar que la resposta observada ha estat induïda pel fong endofític i no es conseqüència de la capacitat parasítica del fong. Per altra banda els resultats obtinguts en valora el pes radicular i els segments radiculars ens demostren que el sistema “*Split root*” no influeix en el desequilibri del desenvolupament del sistema radicular. Només observem en un aïllat, concretament el S2_C5 aplicat en el cogombre cv Dasher II, un increment significatiu del pes radicular respecte el control.

Segons diferents estudis (Baker et al., 1984; Chang et al., 1986) *Trichoderma* promou respostes de creixement en pebrot cogombre, tomàquet i rave. Harman (2000) demostra que *Trichoderma* incrementa el desenvolupament radicular i vegetatiu, la proliferació d'arrels secundàries i l'àrea foliar. Respecte el valor de pes sec, no s'observen diferències significatives, tant en el cogombre cv Dasher com en el tomàquet cv Durinta. Respecte la superfície foliar només s'observen diferències significatives en el cogombre cv Dasher i no en tots els aïllats. En aquest cas verifiquem que *Trichoderma* indueix un creixement de l'àrea foliar com ja havíem comentat anteriorment, però es depenent del cultivar.

Els valors de número d'ous i de masses d'ous ens porta a pensar que la resposta induïda té un patró de comportament completament diferents en Solanàcies que en Cucurbitàcies. La qual cosa s'observa quan calculem l'índex de resistència el qual en el cogombre cv Dasher II ens indica que els aïllats indueixen la infecció dels nematodes, es a dir tenim més infecció en les plantes inoculades amb fong respecte el control. En canvi en el tomàquet cv Durinta s'observa una reducció de la infecció del nematodes, els valors obtinguts de l'índex en tots els tractaments són inferiors a 1, es a dir s'observa una presència d'ous inferior que en el control.

Segons Rotblat et. Al (2002) *Trichoderma* és un potent activador de la via de l'etilè en cultivars específics de tomàquet i tabac. Segons Martínez et. al (2001), el *Trichoderma* indueix

l'activació de la via del salicílic i de l'etilè en meló. Per altra banda *Trichoderma asperellum* (T34) indueix una resposta per la via del SAR i s'observa un increment del salicílic i de l'activitat peroxidasa en cogombre (Segarra et al., 2007). Coneixent l'antagonisme de la via SAR amb la ISR ens podria portar a pensar que el fet de que *Trichoderma* indueix mecanismes diferents segons el cultivar per aquest motiu observem diferències en la resposta induïda.

Per altra banda tenim treballs que demostren que en tomàquet la presència de *Trichoderma* disminueix el número d'ous i de masses d'ous (Abd-Elgawad et al. 2012), segons l'estudi de Fujimoto et al., (2011) realitzar aplicacions foliars de metil jasmonat disminueix la infecció de *Meloidogyne incognita*, la qual cosa coincideix amb els nostres resultats.

Tot i que Glazebrook, (2005) diu que els patògens biotífics, com el nematode, indueix l'activació de la via SAR, Kaloshian (2004) diu que hi ha indicis que els nematodes puguin activar mecanismes similars als artròpodes, es a dir activació de la via del jasmònic.

En el cas del tomàquet podríem arribar a la conclusió que el *Trichoderma* potencia la via del jasmònic activada per la infecció de nematode, en aquest cas la resposta induïda es reflectiria en la disminució de número d'ous de *Meloidogyne spp.* per planta.

Per altra banda trobem resultats similars respecte l'índex de resistència en els casos de la *Pochonia chlamydosporia*, això ens portaria a pensar que té una forma d'acció similar a *Trichoderma*. En els dos casos estem davant de fongs endofítics, tal i com s'han demostrat en aquest treball i com s'esmenta a Larriba et al., (2014), en el cas de *Pochonia*, en Harman (2000) esmenta que existeixen soques de *Trichoderma* amb capacitat endofítica però (De Meyer et al., 1998) parla de la colonització radicular de *Trichoderma*. Faltaria més informació sobre l'acció que té *Pochonia* sobre les vies de resistència de la planta, per justificar i comprovar els resultats obtinguts.

S'hauria d'estudiar quines vies de resistència activen els aïllats estudiats i veure si les respostes induïdes són igual en els diferents grups vegetals, i així poder corroborar i potenciar els resultats obtinguts.

La utilització de fongs endòfits es una via per aconseguir trobar alternatives i solucions als problemes sobre els controls de plagues. A més a més si aquests fongs tenen capacitat parasítica aconseguim disminuir la viabilitat dels estadis del nematode i així disminuir l'inòcul.

CONCLUSIONS

6 CONCLUSIONS

- *Pochonia chlamydosporia* és endòfit radicular de tomàquet, cogombre i meló.
- *Pochonia chlamydosporia* és un paràsit d'ous de *Meloidogyne*, encara que la seva capacitat parasítica varia segons els aïllats, i no té capacitat de parasitar juvenils.
- *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* i *Pochonia chlamydosporia* indueixen resposta sistèmica vers *Meloidogyne spp* en cogombre, incrementant la susceptibilitat de planta al nematode. En tomàquet però, tan sols *Trichoderma asperellum* i *T. harzianum* indueixen resposta en planta, reduint la susceptibilitat de la planta. *Pochonia chlamydosporia* no indueix resposta en tomàquet vers *Meloidogyne*.

BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

Abd-Elgawad, M.M.M., Kabeil, S.S. A. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum* and *Serratia marcescens* and their related enzymatic change in tomato roots. *African Journal of Biotechnology*. 11(96), 16247-16252.

Agrios, G.N., 2005. *Plant pathology*. Ed Elsevier Academic Press.

Backman PA, Sikora RA, (2008). Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control* 46:1–3

Baker, R., Elad, Y i Chet, I. (1984). The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology* 74, 1019-1021.

Becerra Lopez-Lavalle, L.A., N. Potter and C. L. Brubaker. 2012. Development of a rapid, accurate glasshouse bioassay for assessing fusarium wilt disease responses in cultivated *Gossypium* species. *Plant pathology* 61(6), 1112-1120

Bello, A., Esuer, M., Mastrana, M.A. 1994. Los nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. *Patología vegetal* II: 1039-10100. En Llácer G., López M.M., Trapero A. y Bello, A., 1996.-*Patología Vegetal*.S.E.F. –Phytoma España

Bhattarai KK, Xie QG, Mantelin S, Bishnoi U, Girke T, Navarre DA, Kaloshian I, (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Molecular Plant Microbe Interact* 21:1205-14

Bostock, R.M. 2005: Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 545-580

Branch, C., Hwang CF, Navarre DA, Williamson VM, Salicylic acid is part of the Mi-1 mediated defense response to root-knot nematode in tomato. (2004). *MPMI* 17:351-56

Castillo, P. y Verdejo-Lucas, S. 2011. Nematodos fitoparásitos. En: *Enfermedades causada por nematodos fitoparásitos en España*. (Ed. Phytoma). Pp. 19-40.

Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O. & Chet, I. (1986). Increased growth of plant in the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 10, 19-27. Cultivated *Gossypium* species. *Jornal of Plant Pathology* Vol 61 Issue 6, pages 1112-1120.

De Meyer, G., Bigirmana, J., Elad, Y. & Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinera*. *Eur J Plant Pathology* 104, 279-879.

Doherty, H.M., Selvendran, R.R. i Bowles, D.J. 1988: The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiol. Mol. Plant pathology*. 33: 377-384.

FAO, 2002. FAO. Grupo de cultivos hortícoles. (2002). (eds) El Cultivo Protegido en Clima Mediterráneo, pp. Organización para las Naciones Unidas y para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

Ferris H 1985. Population assessment and management strategies for plant-parasitic nematodes. *Agriculture Ecosystems Environment*, 12: 285-299.

Fudali SL, Wang C, Williamson VM. (2013). Ethylene signaling pathway modulates attractiveness of host roots to the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Molecular Plant Microbe Interact.* 26:75-86

Fujimoto, T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, S., Futai, K., and Mizukubo, T. (2011). Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology*. 168, 1253-1258.

Giné, A., M. Bonmatí, A. Sarro, A. Stchigel, J. Valero, C. Ornat, C. Fernández, F.J. Sorribas (2012). Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne spp.* In organic and integrated vegetable production Systems in Spain. *BioControl*. 58:407-416

Giné, A., M. López-Gómez, M.D. Vela, C. Ornat, M. Talavera, S. Verdejo-Lucas & F.X. Sorribas. Requeriments tèrmics i dinàmica de població de *Meloidogyne spp.* en cogombre i pèrdues de producció en hivernacle.

Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. 43: 205-227

Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol – changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 84, 377-393.

Hussey RS i Barker KR 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. *Plant Disease Report* 57:1025–1028

Kaloshian, I. (2004). Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *Journal of chemical ecology*, vol 30, nº 12.

Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Carbonell-Caballera, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Martín-Nieto, J. & Lopez-Llorca, L.V. (2014) Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology* 65, 69-80.

Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Talbot NJ, Lopez-Llorca LV, (2009). Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist* 182 (1): 213-228

Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. & Baccou, J. C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant pathology* 127, 334-1221.

Mohamed Adam, Holger Heuer & Johannes Hallmann (2014) Bacterial Antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by inducing systemic resistance of tomato plants. *Plos one/www.plosone.org*, volume 9.

Nahar K, Kyndt T, De Vleeschauwer D, Höfte M, Gheysen G, (2011). The jasmonate pathway is a key Player in systemically induced defense against root knot. *Plant Physiology* 157:305-16

Nahar, K., Kyndt, T., De Vleeschauwer, D., Höfte, M. & Gheysen, G. The jasmonate pathway is a key Player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiology*. 157, 305-316.

Nandi B, Kundu K, Banerjee N, Babu SPS, (2003). Salicylic acid-induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Nematology* 5:747–752

Netscher, C.; Sikora, A. R. 1990. «Nematode parasites of vegetables». A: Lluc, M.; Sikora, A. R.; Bridge, J. [ed.]. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK: CAB International, p 237-283.

Ornat, C. i Sorribas, F.X. 2008. Integrated Management Of Root-Knot Nematodes On

Mediterranean Horticultural Crops in: Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes Integrated Management of Plant Pest and Diseases, (eds. Cianci, A.I. Mukerji K.G.), Volumen 2, pp: 295-320. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J. 1997. Effect of the previous crop on population densities of *Meloidogyne javanica* and yield of cucumber. *Nematropica*.

Owen KJ, Green CD, Deverall BJ, (2002). A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. In glasshouse-grown grapevine roots. *Australasian Plant Pathology* 31:47–53

Owenga C.O, Thomason I.J, Roberts P.A (1988). A nondestructive technique for screening bean germplasm for resistance to *Meloidogyne incognita* Plant Disease, 72:970–972

Pieterse, C. M. J., Leon_Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S. C. M. 2009: Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nature Chem. Biol.* 5: 308-316

Ren, CG. & Dai, CC. (2012): Jasmonic acid is involved in the signaling pathway for fungal endophyte-induced volatile oil accumulation of *Atractylodes lancea* plantlets. *BMC Plant Biology*, 12:128

Rotbal, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J.M., Shuster, S. & Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant Journal* 32, 1049-1055.

Schaarschmidt, S., M gresshoff, P. & Hause B. (2013) Analyzing the soybean transcriptome during autoregulation of mycorrhization identifies the transcription factors GmNF_YA1a/b as positive regulators of arbuscular mycorrhization. *Genome Biology*, 14:R62

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E & Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 90-96.

Sorribas F J., Ornat C, Galeano M, Verdejo-Lucas S, (2003). Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science & Technology* 13:707-14

Sorribas FJ i Verdejo-Lucas S 1994. Survey of *Meloidogyne* spp. in tomato production fields of Baix Llobregat County, Spain. *Journal Nematology*. 26: 731-6.

Sorribas FJ, Ornat C, Verdejo-Lucas S, Galeano M, Valero J. (2005). Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Eur J Plant Pathology*. 111: 29-38

Sorribas, F.J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., Valero. 2005. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*

Talavera, M., Sayadi, S., Chirisa-Ríos, M., Salmerón, T., Flor-Peregrín, E. & Verdejo-Luacs, S. (2012) Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain. *Nematology*, 14: 517-527.

Taylor, A. L.; Sasser, J. N. (1978). Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina: Department of Plant Pathology, North Carolina State University: US Agency for International Development.

Verdeja-Lucas, S., Sorribas, F.J., Puigdomenech, P. 1994. Pérdida de producción en lechuga y tomate causada por *Meloidogyne javanica* en invernadero. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales* 2: 395-400

Verdejo-Lucas S, Cortada L, Sorribas FJ, Ornat C. (2009). Selection of virulent population of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of Mi resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathol*. 58:990-998

Verdejo-Lucas S, Sorribas F J, Ornat C, Galeano M , (2003). Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathol* 52:521-28;

Whitehead AG, Hemming JR 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annual Applied Biology* 55, 25–38

Yan XN, Sikora RA, Zheng JW, (2011). Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomed & Biotechnol) 12:219-225